

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

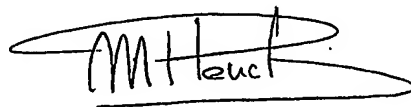
REC'D 26 APR 2004

WIPO PCT

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 MARS 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets



Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 • 8 / 210502

<b>29 JAN 2003</b> REMISE DES PIÈCES DATE <b>29 JAN 2003</b> LIEU <b>INPI LYON</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>29 JAN, 2003</b> <b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) <b>ACRIDINE</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  <b>BIOMERIEUX</b> A l'attention de Mr Laurent CAUCAL Chemin de l'Orme  69280 MARCY L'ETOILE	
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date
Demande de brevet initiale		N°	Date
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> Substrats enzymatiques, milieux de culture les contenant, utilisation pour détecter une activité aminopeptidase et/ou différencier des bactéries à Gram + par rapport à des bactéries à Gram -			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		bioMérieux	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme à Conseil d'Administration	
N° SIREN		16 736 203 999	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	Chemin de l'Orme	
	Code postal et ville	16 928 01 MARCY L'ETOILE	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		04.78.87.53.28 N° de télécopie (facultatif) 04.78.87.21.16	
Adresse électronique (facultatif)		catherine.duret@eu.biomerieux.com	
		<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

29 JAN 2003

Reservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES  
DATE 69 INPI LYON


LIEU

0300953

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE</b>			
Nom		CAUCAL	
Prénom		Laurent	
Cabinet ou Société		bioMérieux	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		PG 7401	
Adresse	Rue	Chemin de l'Orme	
	Code postal et ville	16 09 12 18 10 MARCY L'ETOILE	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)		04.78.87.54.26	
N° de télécopie (facultatif)		04.78.87.21.16	
Adresse électronique (facultatif)		laurent.caucal@eu.biomerieux.com	
<b>7 INVENTEUR(S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requis pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : RG [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>  F. FAVRE	

## DESCRIPTION

La présente invention concerne de nouveaux substrats enzymatiques chromogènes pour la détection d'activité aminopeptidase. Ces substrats sont utilisables dans les applications comportant une étape d'hydrolyse enzymatique produisant un signal physico-chimique notamment en microbiologie, biochimie, immunologie, biologie moléculaire, histologie, etc. L'invention concerne également des milieux de culture contenant de tels substrats, l'utilisation des substrats ou des milieux pour la détection d'activités aminopeptidases et/ou la différenciation de bactéries à Gram positif par rapport à des bactéries à Gram négatif et des procédés d'utilisation.

Comparativement, aux substrats existants, la plupart fluorigènes, ils peuvent être utilisés notamment en milieu gélifiés pour la détection de micro-organismes car ils produisent une coloration ne diffusant pas dans le milieu réactionnel donc concentrée au niveau des colonies.

Des substrats chromogéniques enzymatiques pour la détection d'activité aminopeptidase ne diffusant pas sont décrits et déjà connus de l'état de la technique. Ainsi, de tels substrats sont couverts par les demandes de brevet WO-A-98/04735 et WO-A-99/38995 déposées par la Demanderesse. Néanmoins, ces substrats présentent différents inconvénients : leur synthèse est difficile, la pureté est réduite et les rendements faibles. De plus, pour une utilisation en milieux de culture, il faut définir une composition de milieu très précise pour observer une couleur. Aucun des autres substrats actuellement décrits, ne peut être utilisé en milieux solides pour la détection de micro-organismes en cultures mixtes.

D'autre part, des molécules à base d'acridine sont connues. Elles sont utilisées pour :

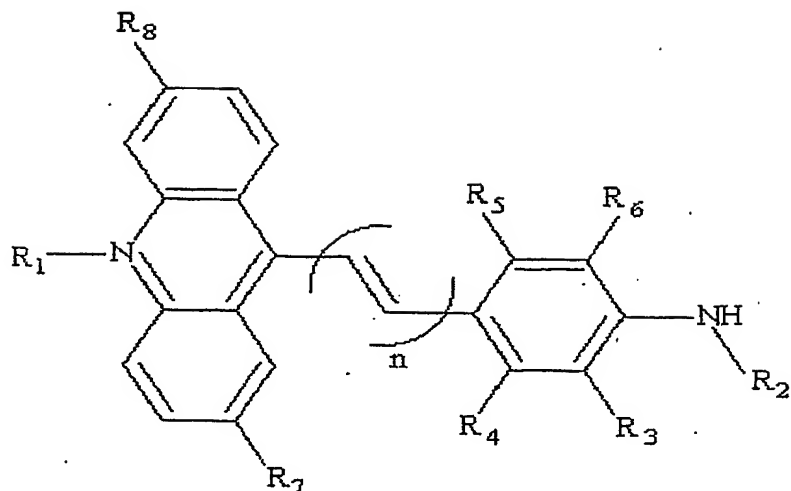
- leurs propriétés de colorant, voir par exemples Rapposch S. *et al.* J. Dairy Sci. 2000 Dec ; 83 (12) : 2753-2758, ou bien par exemple Giorgio A. *et al.* Microbiologica 1989 Jan ; 12 (1) : 97-100,

- leurs propriétés chimiothérapeutiques, par exemple Costes N. *et al.* J. Med. Chem. 2000 Jun 15 ; 43 (12) : 2395-2402, ou
- effectuer des intercalations dans l'ADN, par exemples Okwumabua O. *et al.* Res. Microbiol. 1992 Feb ; 143 (2) : 183-189 ou encore par exemple Schelhorn T. *et al.* Cell. Mol. Biol. 1992 Jul ; 38 (4) : 345-365.

Le brevet EP-B-0.270.946 propose des substrats enzymatiques chromogéniques à base d'acridinone, qui est un dérivé de l'acridine. Le radical, qui peut être clivé par une enzyme, est présent au niveau de la position 7 du groupement acridine. Sa structure ne permet la révélation que des activités enzymatiques suivantes : estérases et glycosidases.

Conformément à la présente invention, il est proposé de nouveaux substrats chromogéniques enzymatiques pour la détection chez des micro-organismes d'une activité aminopeptidase ou pour définir l'appartenance d'au moins une bactérie au groupe des Gram positifs ou des Gram négatifs selon sa coloration. L'invention concerne également des milieux de culture contenant de tels substrats, l'utilisation des substrats ou des milieux pour la détection d'activités aminopeptidases et/ou la différenciation de bactéries à Gram positif par rapport à des bactéries à Gram négatif et des procédés d'utilisation

A cet effet, la présente invention concerne des substrats chromogéniques enzymatiques pour la détection chez des micro-organismes d'une activité aminopeptidase ou pour définir l'appartenance d'au moins une bactérie au groupe des Gram positifs ou des Gram négatifs selon sa coloration. Ils ont la formule suivante :

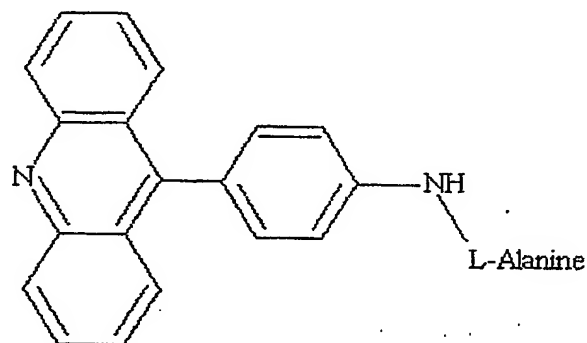


dans laquelle :

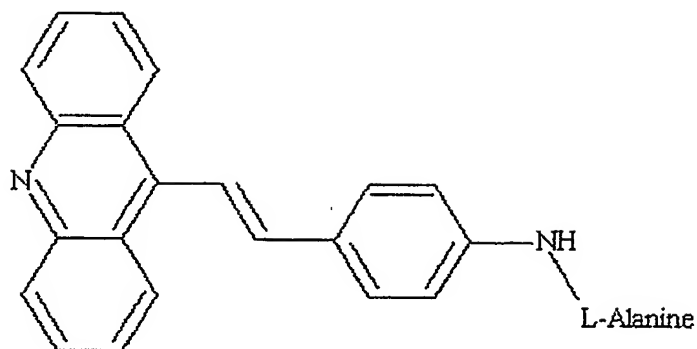
- $R_1$  est rien ou un groupement alkyle, allyle, aryle,
- $R_2$  est constitué par au moins un acide aminé, préférentiellement alanine,
- $R_3, R_4, R_5$  et  $R_6$  sont constitués indépendamment l'un de l'autre par H- ou -O-alkyle, préférentiellement -O-CH<sub>3</sub>,
- $R_7$  est constitué par H, O-CH<sub>3</sub>, alkyle ou halogène,
- $R_8$  est constitué par H ou Cl, et
- $n$  est un chiffre entier correspondant à 0 ou 1 ou 2.

10

Selon un mode de réalisation, le substrat a la formule suivante :

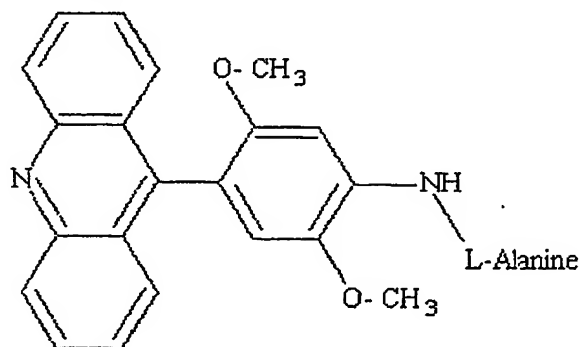


ou il a la formule suivante :

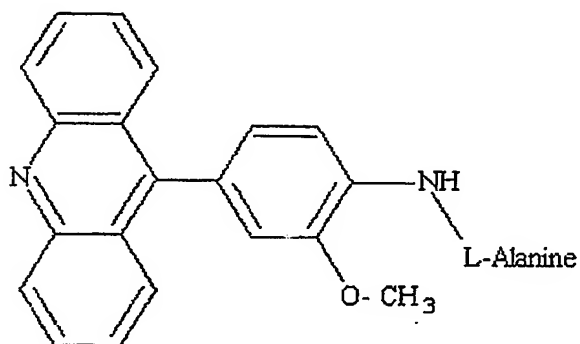


5 Selon un autre mode de réalisation, le substrat répond à la formule ci-dessus dans laquelle  $R_1$  est un groupement méthyle ou allyle.

Selon encore un autre mode de réalisation, le substrat a la formule suivante :



ou il a la formule suivante :



L'invention concerne également un milieu de culture utilisant au moins un substrat chromogénique enzymatique, tel que décrit ci-dessus, seul ou en combinaison

avec au moins un autre substrat enzymatique spécifique d'une activité enzymatique différente d'une activité de celle détectée par le substrat selon l'invention.

Préférentiellement, ce milieu est constitué par un milieu gélifié.

5 La présente invention a trait également à l'utilisation des substrats chromogéniques enzymatiques, tels que décrits ci-dessus, ou d'un milieu de culture, également décrit ci-dessus, pour la détection chez des micro-organismes d'au moins une activité aminopeptidase.

10 La présente invention a toujours pour objet l'utilisation des substrats chromogéniques enzymatiques, tels que décrits ci-dessus, ou d'un milieu de culture, également décrit ci-dessus, pour séparer les bactéries à coloration à Gram positif des bactéries à coloration à Gram négatif.

15 L'invention concerne enfin un procédé pour la détection chez des micro-organismes d'au moins une activité aminopeptidase, ce procédé consiste à :

- disposer d'un milieu de culture, selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6,
  - ensemer le milieu avec un échantillon biologique à tester,
  - laisser incubé, et
  - révéler la présence d'au moins une activité aminopeptidase seule ou en combinaison
- 20 avec au moins une autre activité enzymatique différente.

L'invention concerne aussi un autre procédé pour la différenciation chez des bactéries de leur appartenance aux germes du type Gram positif ou aux germes du type Gram négatif, ce procédé consiste à :

- disposer d'un milieu de culture, selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6,
- 25 • ensemer le milieu avec un échantillon biologique à tester,
- laisser incubé, et
- révéler la présence d'au moins une coloration synonyme de la présence de germe(s) du type Gram négatif.

30 Quelque soit le procédé utilisé, lorsque l'azote en position 10 du groupement acridine n'est pas quaternisé, la révélation de la présence d'au moins une activité aminopeptidase est réalisée par l'ajout d'acide, préférentiellement d'acide

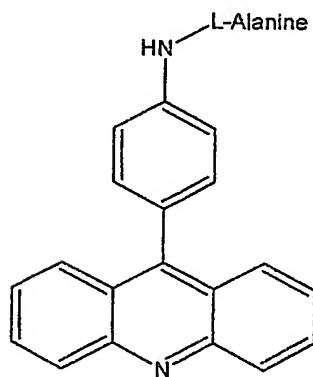
chlorhydrique, d'acide acétique ou d'acide citrique, sur la culture. Par quaternisé, il faut comprendre que l'azote en position 10 du groupement acridine est tétravalent, c'est-à-dire qu'il est lié par trois liaisons classiques avec le cycle phényl et une liaison complémentaire avec un radical, de sorte que ledit atome d'azote est porteur d'une charge positive et est donc cationique. Dans ce cas, la molécule est sous la forme d'un sel, par exemple un sel de chlorure, bromure ou trifluoro acétate.

Toutes les réactions, qui vont être décrites ci-dessous dans les exemples, ont été suivies en chromatographie sur couche mince (CCM) et les structures des produits ont été confirmées par spectrométrie de masse (MS) et résonance magnétique nucléaire (RMN).

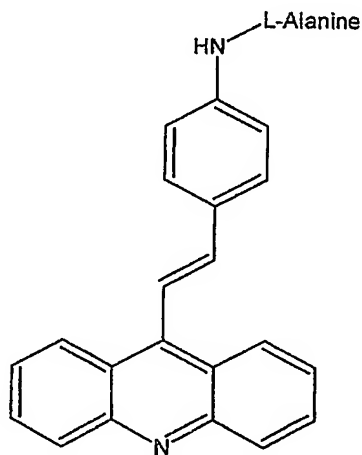
**Exemple 1 : Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide de substrats non quaternisés :**

**1.1 : Molécules utilisées :**

On a réalisé une étude comparative de deux substrats à base d'acridine le L-Alanyl-9-(4-aminostyryl)acridine, ci-après référencé L-Ala-4-ASA, et le L-Alanyl-aminophenylacridine (substrats non quaternisés), ci-après référencé L-Ala-APA, de formules respectives :



L-Alanyl-aminophenylacridine



L-Alanyl-9-(4-aminostyryl)acridine

## 1.2 : Synthèse des substrats :

### 1.2.1 : Synthèse du L-Ala-4-ASA :

5 Cette synthèse s'effectue en plusieurs étapes.

#### Préparation de 9-chloroacridine :

10 La préparation est effectuée en utilisant la méthode de Lehmstedt et Schrader qui a été référencée par Albert dans son livre ' The Acridines ', Arnold, second edition, (1966), page 33.

#### Préparation de 9-méthylacridine

15 La méthode de Campbell, Franklin, Morgan et Tivey (réf. *J. Chem. Soc.*, 1958, 1145) a été utilisée. Les rendements ont atteint 90%.

#### Préparation de 9-(4-nitrostyryl) acridine par fusion

20 Un mélange de 9-méthylacridine (4,83 g , 25,0 mmole), 4-nitrobenzaldéhyde (4,23 g, 31,25 mmole) et chlorure de zinc (5,06 g, 31,25 mmole) est chauffé à 130°C pendant 3 heures avec un bain d'huile. Le solide récupéré est chauffé dans une solution de sodium metabisulfite pour éliminer l'excès de l'aldéhyde et le mélange chaud est filtré. Des précipités obtenus sont dissous dans une quantité minimum de tétrahydrofurane et de  
25 l'eau est ajoutée dans la solution pour avoir le produit sous forme de précipités. Ces précipités sont récupérés par une filtration et séchés. Le produit peut être recristallisé dans l'éthanol. Le rendement est de 35%.

#### Préparation de t-Boc-alanyl-9-(4-nitrostyryl) acridine

Le produit t-Boc-alanine (3,79 g, 20,0 mmole) est dissous dans une quantité minimum de tétrahydrofuranne (THF) anhydride et la solution est refroidie à -15°C à l'aide d'un mélange éthylène glycol/carbone glace dans un bain. Le N-méthylmorpholine (NMM) (2,02 g, 20 mmole) est ajouté goutte à goutte dans le mélange. Le chloroformate d'isobutyle (IBCF) (2,53 g, 20,0 mmole) est ensuite introduit goutte à goutte dans le mélange réactionnel. Il faut que la température soit au-dessous de -10°C. Au bout de 3 minutes environ, le 9-(4-nitrostyryl) acridine (5,4 g, 20 mmole), qui est dissous dans une quantité minimum de tétrahydrofuranne (THF) anhydride et refroidi à -15°C, est introduit. Le mélange réactionnel est agité et on le laisse revenir à la température ambiante. Le sel de N-méthylmorpholine est éliminé par une filtration avec un entonnoir à plaque filtrante. Le mélange est évaporé jusqu'à son quatrième volume original avec un évaporateur rotatif. Le filtrat est introduit goutte à goutte dans un mélange eau/glace en quantité importante sous agitation. Des précipités jaunes, formés, sont récupérés par une filtration, lavés avec de l'eau et séchés. Le produit peut être recristallisé dans le méthanol. Le rendement est de sensiblement 75 %.

D'autres analogues des acides aminés protégés par le t-Boc ont aussi été utilisés pour former de nouveaux produits. Les acides aminés sont : la proline, la glycine, la sérine et la  $\beta$ -alanine. Les rendements pour ces produits sont dans la zone de 60 à 80 %, les résultats étant généralement les meilleurs pour les analogues de la  $\beta$ -alanine et les moins bons pour les analogues de la sérine.

### 1.2.2 : Synthèse du L-Ala-APA :

La préparation de 9-(4-aminophényl) acridine par une réaction de soufre fondu peut être réalisée par deux méthodes différentes.

#### Méthode A

L'acridine chlorhydrique (9,7 g, 45,0 mmole), l'aniline (8,37 g, 90,0 mmole) et 10,0 g de soufre sont bien mélangés et chauffés à 130°C pendant 4 heures sous une hotte efficace. Le milieu réactionnel dans le ballon est refroidi à température ambiante et dissous dans le méthanol chaud pour donner une solution de couleur rouge sanguine. La

solution est refroidie et le soufre est éliminé par une filtration. L'alcanilisation du filtrat est réalisée à l'aide d'une solution d'ammoniaque concentrée. Des précipités jaunes légers, formés, sont filtrés puis lavés avec le méthanol froid. Le rendement est de 65%.

## 5 Méthode B

L'acridine (8,06 g, 45,0 mmole), l'aniline chlorhydrique (11,61 g, 90 mmole) et 10,0 g de soufre sont bien mélangés et chauffés à 130°C pendant 4 heures. Le milieu réactionnel est ensuite traité comme dans la Méthode A ci-dessus.

10 Ensuite on réalise une préparation sur la base de l'une et/ou l'autre des deux méthodes précédentes.

## Préparation de t-Boc-alanyl-9-(4-aminophényl) acridine

15 Le produit t-Boc-alanine (3,79 g, 20,0 mmole) est dissous dans une quantité minimum de tétrahydrofuranne (THF) anhydride et la solution est refroidie à -15°C à l'aide d'un mélange éthylène glycol/carbone glace dans un bain. Le N-méthylmorpholine (NMM) (2,02 g, 20 mmole) est ajouté goutte à goutte dans le mélange. Le chloroformate d'isobutyle (IBCF) (2,53 g, 20,0 mmole) est ensuite introduit goutte à goutte dans le  
20 mélange réactionnel. Il faut que la température soit au-dessous de -10°C. Au bout de 3 minutes environ, le 9-(4-aminophényl) acridine (5,4 g, 20 mmole), qui est dissous dans une quantité minimum de tétrahydrofuranne (THF) anhydride et refroidi à -15°C, est introduit. Le mélange réactionnel est agité et on le laisse revenir à la température ambiante. Le sel de N-méthylmorpholine est éliminé par une filtration avec un  
25 entonnoir à plaque filtrante. Le mélange est évaporé jusqu'à son quatrième volume original avec un évaporateur rotatif. Le filtrat est introduit goutte à goutte dans un mélange eau/glace en quantité importante sous agitation. Des précipités jaunes, formés, sont récupérés par une filtration, lavés avec de l'eau et séchés. Le produit peut être recristallisé dans le méthanol. Le rendement est de 75%.

D'autres analogues des acides aminés protégés par le t-Boc ont aussi été utilisés pour former de nouveaux produits. Les acides aminés sont : la proline, la glycine, la sérine et la  $\beta$ -alanine. Les rendements pour ces produits sont dans la zone de 60 à 80% : les résultats étant généralement les meilleurs pour les analogues de la  $\beta$ -alanine et les moins bons pour les analogues de la sérine.

### 1.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant du L-Alanyl-9-(4-aminostyryl)acridine (ci-après référencé L-Ala-4-ASA) ou du L-Alanyl-aminophenylacridine (ci-après référencé L-Ala-APA) est préparé comme suit : 46,37 g d'agar Columbia sont additionnés à 1 litre d'eau distillée puis autoclavés. Ce milieu réactionnel est séparé en deux milieux de volume équivalent. Chacun de ces milieux comprend respectivement : 0,3 g/l de L-Ala-4-ASA apporté par une solution mère dans du DMSO et 0,3 g/l de L-Ala-APA apporté aussi par une solution mère dans du DMSO.

Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont été ensemencés sur chacun des milieux par isolement en trois cadrans à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24 heures d'incubation. La coloration de ces colonies a été notée avant et après ajout d'une goutte d'acide chlorhydrique.

### 1.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous. En absence d'HCl, les deux substrats ne donnent pas de coloration spontanée. En présence d'une goutte d'HCl, les colonies possédant l'activité L-Alanine-aminopeptidase sont colorées en gris-mauve à mauve. Les colonies ne possédant pas cette activité demeurent incolores. Ces substrats sont donc sensibles et spécifiques. Ils peuvent permettre dans le cas d'une culture mixte Gram positif et Gram négatif de séparer les deux types de germes.

ESPECES (N° souche interne)	0,3 g/l L-Ala-4-ASA sans HCl	0,3 g/l L-Ala-APA sans HCl	0,3 g/l L-Ala-4-ASA avec HCl	0,3 g/l L-Ala-APA avec HCl
<i>Escherichia coli</i>	incolore	incolore	gris mauve	mauve pâle
<i>Proteus mirabilis</i>	incolore	incolore	gris mauve	mauve très pâle pâle
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	incolore	incolore	gris mauve	mauve
<i>Enterobacter cloacae</i>	incolore	incolore	gris mauve	mauve
<i>Citrobacter koseri</i>	incolore	incolore	gris mauve	mauve
<i>Streptococcus agalactiae</i>	incolore	incolore	incolore	incolore
<i>Enterococcus faecalis</i>	incolore	incolore	incolore	incolore
<i>Staphylococcus aureus</i>	incolore	incolore	incolore	incolore
<i>Listeria innocua</i>	incolore	incolore	incolore	incolore
<i>Candida albicans</i>	incolore	incolore	incolore	incolore

**Tableau 1 :** Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes par la L-Ala-4-ASA ou la L-Ala-APA sur milieu gélifié

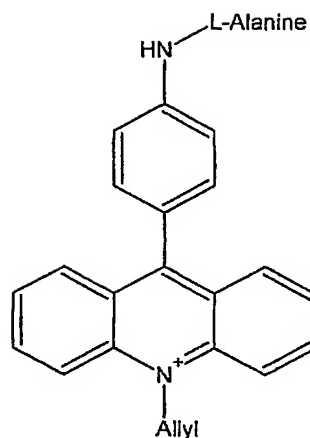
5

**Exemple 2 :** Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide de substrat quaternisé :

10

### 2.1 : Molécule utilisée :

L'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié est réalisée par l'utilisation du L-Alanyl-9(4-aminophenyl)-10-allyl-acridinium chloride (substrat quaternisé), ci-après désigné L-Ala-4-AP-10-AA, de formule :



L-Alanyl-9(4-aminophenyl)-10-allyl-acridinium chloride

## 2.2 : Synthèse de L-Ala-4-AP-10-AA :

5

Le composé de départ est le t-Boc-alanyl-9-(4-aminophényl) acridine dont la synthèse a déjà été exposée au paragraphe 1.2.2 (Synthèse du L-Ala-APA). Dans un flacon de 10 ml qui peut être fermé, le t-Boc-alanyl-9-(4-aminophényl) acridine (0,88 g, 2,0 mmole) est introduit dans le tétrahydrofurane anhydride (4,0 ml) et le mélange est mis en l'ébullition pour avoir une solution partielle. La solution / suspension est refroidie et l'allyle bromide (2,0 ml) est ajouté. Le flacon est ensuite fermé et incubé à 40°C pendant plus de 100 heures. Le réactif solide est dissous au fur et à mesure en formant une solution orange. Des cristaux orangés - noirs apparaissent dans cette solution.

15

A l'issue des 100 heures, le mélange réactionnel est transféré dans l'acétate d'éthyle (100 ml) sous agitation. Après une durée nécessaire, le sel quaternaire est filtré et lavé avec l'éther éthylique.

20

Le produit est dissous dans une quantité minimum d'éthanol et agité avec l'acétate d'éthyle (10 ml) saturé par HCl. Des précipités, qui sont formés quelques heures après, sont récupérés par une filtration sous pression réduite. L'introduction de l'éther éthylique dans le filtrat permet de récupérer le produit en plus. Les fractions réunies du produit sont lavées avec l'éther éthylique et séchées rapidement pour éviter l'absorption d'humidité.

### 2.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant comme substrat du L-Ala-4-AP-10-AA est préparé comme suit : 46,37 g d'agar Columbia sont additionnés à 1 litre d'eau distillée puis autoclavés. Ce milieu réactionnel est séparé en trois milieux de volume équivalent. Chacun de ces milieux comprend respectivement : 0,1 g/l, 0,2 g/l, 0,4 g/l de L-Ala-4-AP-10-AA apporté par une solution mère dans du DMSO.

Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont été ensemencés sur chacun des milieux par isolement en trois cadrans à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24 et 48 heures d'incubation. La coloration de ces colonies ainsi que l'intensité de cette coloration ont été notées.

### 2.4 : Résultats :

Les résultats sont exprimés en intensité de coloration en se basant sur une échelle arbitraire allant de 0 à 4. Ces résultats sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous.

Ce substrat permet de révéler une activité L-Alanine-aminopeptidase chez les bactéries à Gram négatif par l'apparition spontanée (sans ajout d'acide) d'une couleur concentrée au niveau des colonies. Les colonies ne possédant pas cette activité demeurent incolores. Ce substrat est donc sensible et spécifique. Il peut permettre dans le cas d'une culture mixte Gram positif et Gram négatif de séparer les deux types de germes. Le fait de « quaterniser » l'azote en position 10 du groupement acridine permet d'obtenir une réaction spontanée sans ajout d'acide comparativement à la même molécule non quaternisée décrite dans l'exemple 1.

SOUCHES	Temps d'incu- -bation	0,1 g/l de L-Ala-4-AP-10-AA		0,2 g/l de L-Ala-4-AP-10-AA		0,4 g/l de L-Ala-4-AP-10-AA	
		Couleur	Intensité	Couleur	Intensité	Couleur	Intensité
<i>Escherichia coli</i> (032)	24 H	beige	0,5	rose-orange	2	rose-orange	2,5
	48 h	beige	0,5	rose-orange	2	rose-orange	3
<i>Proteus mirabilis</i> (103)	24 H	beige	traces	rose-orange	0,5	rose-orange	3
	48 h	beige	traces	rose-orange	1	rose-orange	3
<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> (023)	24 H	beige	traces	rose-orange	1	rose-orange	3
	48 h	beige	traces	rose-orange	2	rose-orange	3,5
<i>Citrobacter koseri</i> (090)	24 H	beige	0,5	rose-orange	1	rose-orange	3
	48 h	beige	0,5	rose-orange	2	rose-orange	3,5
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (070)	24 H	inhibé	-	inhibé	-	inhibé	-
	48 h	inhibé	-	inhibé	-	inhibé	-
<i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> (067)	24 H	inhibé	-	inhibé	-	inhibé	-
	48 h	incolore	-	incolore	-	incolore	-
<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> (075)	24 H	incolore	-	orange	traces	orange	traces
	48 h	incolore	-	orange	0,5	orange	1
<i>Listeria innocua</i> (036)	24 H	incolore	-	incolore	-	incolore	-
	48 h	incolore	-	incolore	-	incolore	-
<i>Candida albicans</i> (056)	24 H	incolore	-	incolore	-	incolore	-
	48 h	incolore	-	incolore	-	incolore	-

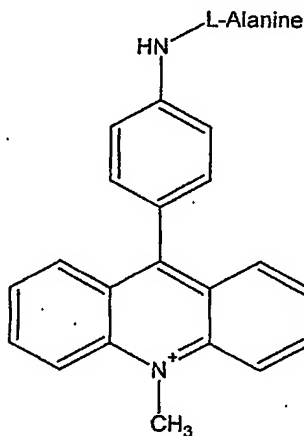
**Tableau 2 :** Influence de la concentration en substrat dans la révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes par désigné la L-Ala-4-AP-10-AA

5

**Exemple 3 :** Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide d'un autre substrat quaternisé :

### 3.1 : Molécule utilisée :

La révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié s'effectue par l'utilisation d'un substrat appelé L-Alanyl-9(4-aminophenyl)-10-methyl-acridinium chloride (substrat quaternisé), ci-après appelé L-Ala-4-AP-10-MA, dont la formule est la suivante :



L-Alanyl-9(4-aminophenyl)-10-methyl-acridinium chloride

### 3.2 : Synthèse de L-Ala-4-AP-10-MA :

Cette synthèse a déjà été réalisée au paragraphe 2.2 ci-dessus, dans laquelle l'allyle bromide a été remplacé par l'iodure de méthyle. Il convient de s'y reporter pour connaître la synthèse de la L-Ala-4-AP-10-MA.

### 3.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant 300 mg/l de L-Ala-4-AP-10-MA, est préparé comme suit : 46,37 g d'agar Columbia sont additionnés à 1 litre d'eau distillée puis autoclavés, le substrat est ensuite apporté par une solution mère dans du DMSO. Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont été ensemencés sur le milieu par isolement en trois cadrans à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les

boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24 et 48 heures d'incubation. La coloration de ces colonies ainsi que l'intensité de cette coloration ont été notées.

5

### 3.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous :

SOUCHES	Temps d'incubation	0,3 g/l de L-Ala-4-AP-10-AA	
		Couleur	Intensité
<i>Escherichia coli</i> (032)	24 H	rose-orange	3,5
	48 h	rose-orange	3,5
<i>Proteus mirabilis</i> (103)	24 H	rose-orange	1
	48 h	rose-orange	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (023)	24 H	rose-orange	3
	48 h	rose-orange	3
<i>Citrobacter koseri</i> (090)	24 H	rose-orange	3
	48 h	rose-orange	3
<i>Staphylococcus aureus</i> (070)	24 H	inhibé	-
	48 h	inhibé	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> (067)	24 H	inhibé	-
	48 h	inhibé	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (075)	24 H	rose	traces
	48 h	rose-orange	0,5
<i>Listeria innocua</i> (036)	24 H	incolore	-
	48 h	rose-orange	traces
<i>Candida albicans</i> (056)	24 H	incolore	-
	48 h	incolore	-

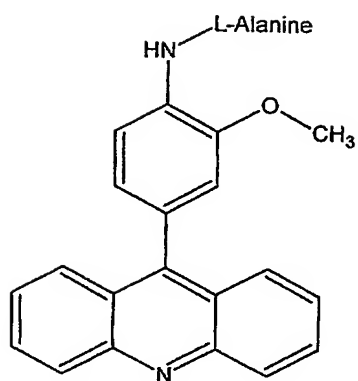
**Tableau 3 :** Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes par de la L-Ala-4-AP-10-AA dont la concentration en substrat est optimisée

Ce substrat permet de révéler une activité L-Alanine-aminopeptidase chez les bactéries à Gram négatif par l'apparition spontanée (sans ajout d'acide) d'une couleur rose-orange concentrée au niveau des colonies. Les colonies ne possédant pas cette activité demeurent incolores. Ce substrat est donc sensible et spécifique. Il peut permettre dans le cas d'une culture mixte Gram +/Gram - de séparer les deux types de germes. Comparativement au substrat décrit dans l'exemple 2, il semble permettre d'obtenir des intensités de coloration plus fortes pour les souches positives. La différence entre ces deux substrats est le type de groupement en position 10 sur l'azote du noyau d'acridine.

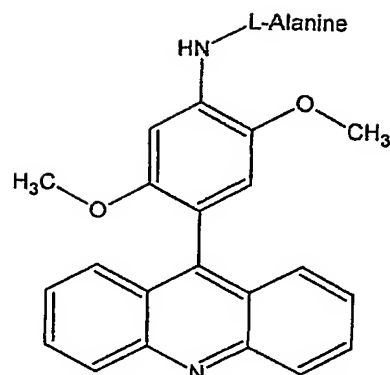
**Exemple 4 :** Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide d'autres substrats non quaternisés :

**4.1 :** Molécules utilisées :

La révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié s'effectue par l'utilisation de deux substrats appelés L-Alanyl-2-methoxyaminophenylacridine, ci-après appelé L-Ala-2-MeOAPA, et L-Alanyl-2,5-dimethoxyaminophenylacridine, ci-après appelé L-Ala-2,5-diMeOAPA, dont les formules sont respectivement les suivantes :



L-Alanyl-2-methoxyaminophenylacridine



L-Alanyl-2,5-dimethoxyaminophenylacridine

## 4.2 : Synthèse des substrats :

### 4.2.1 : Synthèse du L-Ala-2-MeOAPA :

Sur la base de ce qui est décrit au point 1.2.2 ci-dessus, d'autres analogues d'aniline sont aussi utilisés pour former des nouveaux produits, y compris l'anisidine (3-méthoxyaniline) qui donne le 9-(4-amino-2-méthoxyphényl) acridine.

### 4.2.2 : Synthèse du L-Ala-2,5-diMeOAPA :

Sur la base de ce qui est décrit au point 1.2.2 ci-dessus, d'autres analogues d'aniline sont aussi utilisés pour former des nouveaux produits, y compris le 2,5-diméthoxyaniline qui donne le 9-(4-amino-2,5-diméthoxyphényl) acridine.

## 4.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant du L-Ala-2-MeOAPA ou du L-Ala-2,5-diMeOAPA est préparé comme suit : 46,37 g d'agar Columbia sont additionnés à 1 litre d'eau distillée puis autoclavés. Ce milieu réactionnel est séparé en deux milieux de volume équivalent. Chacun de ces milieux comprend respectivement : 0,3 g/l de L-Ala-2-MeOAPA apporté par une solution mère dans du DMSO et 0,3 g/l de L-Ala-2,5-diMeOAPA apporté aussi par une solution mère dans du DMSO. Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont été ensemencés sur chacun

des milieux par isolement en trois cadrans à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. La coloration de ces colonies ainsi que l'intensité de cette coloration ont été notées après ajout d'HCl.

5

#### 4.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 4 ci-dessous :

SOUCHES	Temps d'incubation	L-Ala-2- MeOAPA		L-Ala-2,5-di MeOAPA	
		Couleur	Intensité	Couleur	Intensité
<i>Escherichia coli</i> (032)	24 H	orange	0,5	jaune orange	1,5
	48 h	rose	3,5	jaune orange	2
<i>Proteus mirabilis</i> (037)	24 H	orange	1	incolore	0,
	48 h	orange	1,5	orange	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (023)	24 H	rose	3	orange	1
	48 h	rose	3,5	jaune orange	2,5
<i>Citrobacter koseri</i> (012)	24 H	orange	2	orange	1
	48 h	rose	3,5	jaune orange	2,5
<i>Enterobacter cloacae</i> (061)	24 H	rose	2	jaune orange	1,5
	48 h	rose	2	jaune orange	2
<i>Staphylococcus aureus</i> (035)	24 H	incolore*	0	incolore	0
	48 h	incolore*	0	incolore	0
<i>Streptococcus agalactiae</i> (001)	24 H	inhibé	-	incolore	0
	48 h	inhibé	-	incolore	0
<i>Enterococcus faecalis</i> (117)	24 H	inhibé	-	jaune orange	0,5
	48 h	inhibé	-	jaune orange	3
<i>Listeria innocua</i> (036)	24 H	incolore*	0	incolore	0
	48 h	incolore*	0	incolore	0
<i>Candida albicans</i> (077)	24 H	inhibé	-	incolore	0
	48 h	inhibé	-	incolore	0

\* croissance très faible

Tableau 4 : Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes par les L-Ala-2-MeOAPA et L-Ala-2,5-diMeOAPA

5

Ces deux substrats permettent après ajout d'une goutte d'HCl de révéler une activité L-Alanine-aminopeptidase chez les bactéries à Gram positif. L'ajout de substituants (Méthoxy-) sur le groupement phényle permet en plus de réduire la toxicité des substrats, notamment vis-à-vis des bactéries à Gram positif. Cependant, ce gain en fertilité se fait au détriment de la spécificité, en effet, *Enterococcus faecalis* présente une activité avec le L-Ala-2,5-diMeOAPA après 48 heures d'incubation.

10

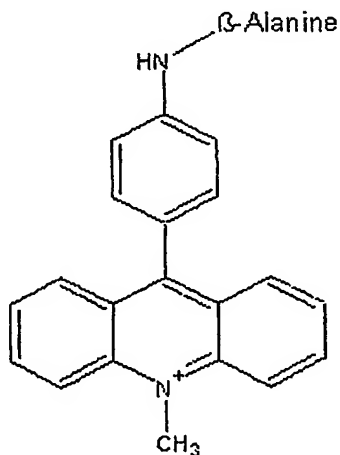
Exemple 5 : Révélation de l'activité  $\beta$ -Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié : utilisation du  $\beta$ -Alanyl-9(4-aminophenyl)-10-methyl-acridinium chloride (substrat quaternisé) :

15

#### 5.1 : Molécule utilisée :

20

La révélation de l'activité  $\beta$ -Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié s'effectue par l'utilisation d'un substrat appelé  $\beta$ -Alanyl-9(4-aminophenyl)-10-methyl-acridinium chloride (substrat quaternisé), ci-après appelé  $\beta$ -Ala-4-AP-10-MA, dont la formule est la suivante :



## $\beta$ -Alanyl-9-(4-aminophenyl)-10-methyl-acridinium chloride

### 5.2 : Synthèse de $\beta$ -Ala-4-AP-10-MA :

Le composé de départ est le t-Boc-alanyl-9-(4-aminophényl) acridine dont la synthèse a déjà été exposée au paragraphe 1.2.2 (Synthèse du L-Ala-APA). Le t-Boc-alanyl-9-(4-aminophényl) acridine (0,67 g, 1,5 mmole) est dissous dans l'acétonitrile (volume minimum) et chauffé à reflux avec de l'allyl bromure (3-bromo-1-propène) (4,0 ml) pendant 4 heures. Des composés volatils sont éliminés par évaporation. Le résidu est dissous dans l'éthanol et isolé par recristallisation ou précipitation. La déprotection est la même que celle décrite précédemment.

### 5.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant 300 mg/l de  $\beta$ -Ala-4-AP-10-MA est préparé comme suit : 46,37 g d'agar Columbia sont additionnés à 1 litre d'eau distillée puis autoclavés, le substrat est ensuite apporté par une solution mère dans du DMSO. Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont été ensemencés sur le milieu par isolement en trois cadrans à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24 et 48 heures d'incubation. La coloration de ces colonies ainsi que l'intensité de cette coloration ont été notées.

### 5.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 5 ci-dessous.

Ce substrat permet de révéler une activité  $\beta$ -Alanine-aminopeptidase chez les bactéries à Gram négatif par l'apparition spontanée (sans ajout d'acide) d'une couleur orange concentrée au niveau des colonies. Les colonies ne possédant pas cette activité demeurent incolore. Ce substrat est donc sensible et spécifique. Il peut permettre d'identifier les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et notamment de les différencier des autres bactéries.

SOUCHES	Temps d'incubation	0,3 g/l de $\beta$ -Ala-4-AP-10-MA	
		Couleur	Intensité
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (052)	24 H	orange	2
	48 h	orange	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (165)	24 H	orange	1,5
	48 h	orange	3
<i>Burkholderia cepacia</i> (004)	24 H	incolore	-
	48 h	incolore	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (016)	24 H	inhibé	-
	48 h	incolore	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (073)	24 H	inhibé	-
	48 h	incolore	-
<i>Pseudomonas putida</i> (028)	24 H	incolore	-
	48 H	incolore	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (034)	24 H	incolore	-
	48 H	incolore	-
<i>Escherichia coli</i> (032)	24 H	incolore	-
	48 H	incolore	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (023)	24 H	incolore	-
	48 H	incolore	-

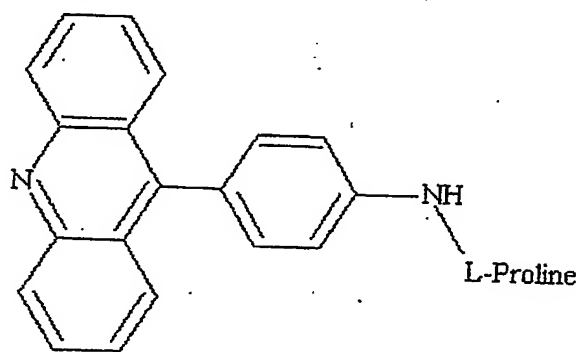
**Tableau 5 :** Révélation de l'activité  $\beta$ -Alanine-aminopeptidase de micro-organismes par de la  $\beta$ -Ala-4-AP-10-MA

5

**Exemple 6 :** Révélation de l'activité L-Proline-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide d'un substrat non quaternisé à base de Proline :

6.1 : Molécule utilisée.:

La révélation de l'activité L-Proline-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié s'effectue par l'utilisation d'un substrat appelé L-Prolyl-9(4-aminophenyl)-acridine (substrat non quaternisé), ci-après appelé L-Pro-4-APA, dont la formule est la suivante :



L-Prolyl-9(4-aminophenyl)acridine

#### 6.2 : Synthèse de L-Pro-4-APA :

Cette synthèse a déjà été réalisée au paragraphe 1.2 ci-dessus, selon deux méthodes A et B, dans lesquelles l'acide aminé Alanine a été remplacé par l'acide aminé Proline. Il convient de s'y reporter pour connaître la synthèse de la L-Pro-4-APA.

#### 6.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant du L-Prolyl-9-(4-aminophenyl)acridine (ci-après référencé L-Pro-4-APA) est préparé comme suit : 45g d'agar Sabouraud sont additionnés à 1 litre d'eau distillée puis autoclavés. Ce milieu réactionnel comprend 0,3 g/l de L-Pro-APA apporté aussi par une solution mère dans du DMSO.

Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont été ensemencés sur ce milieu par isolement en trois cadrans à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24 heures d'incubation. La coloration de ces colonies a été notée avant et après ajout d'une goutte d'acide acétique, ci-après GAA (glacial acetic acid).

#### 6.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 6 ci-dessous :

SOUCHES	Goutte d'Acide Acétique	0,3 g/l de L-Pro-4-APA	
		Couleur	Intensité
<i>Candida albicans</i> (138)	avant GAA	jaune	2
	après GAA	jaune	3
<i>Candida parapsilosis</i> (040)	avant GAA	blanc	-
	après GAA	jaune	2
<i>Candida lusitaniae</i> (045)	avant GAA	pas de croissance	-
	après GAA	pas de croissance	-
<i>Candida guilliermondii</i> (046)	avant GAA	pas de croissance	-
	après GAA	pas de croissance	-
<i>Candida krusei</i> (026)	avant GAA	jaune	1
	après GAA	jaune	3
<i>Candida glabrata</i> (051)	avant GAA	jaune	2
	après GAA	jaune	3

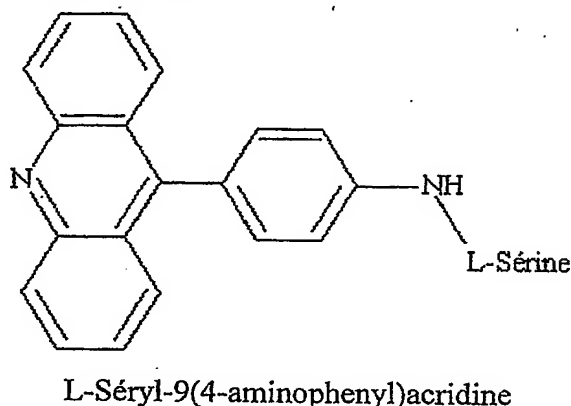
**Tableau 6 :** Révélation de l'activité L-Proline-aminopeptidase de micro-organismes par de la L-Pro-4-APA dont la concentration en substrat est optimisée

Avec certaines souches de levures *Candida*, la nature inhibitrice du substrat est démontrée. Cependant, certaines levures produisent une coloration jaune, sans l'addition d'acide. Cette coloration est plus intense pour certaines souches, notamment *Candida albicans*, elle est également plus intense qu'en l'absence de culture. Ceci démontre bien que notre substrat, contenant la Proline comme acide aminé, permet de révéler l'activité L-Proline-aminopeptidase chez les levures.

**Exemple 7 :** Révélation de l'activité L-Sérine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide d'un substrat non quaternisé à base de Sérine :

### 7.1 : Molécule utilisée :

La révélation de l'activité L-Sérine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié s'effectue par l'utilisation d'un substrat appelé L-Séryl-9(4-aminophenyl)-acridine (substrat non quaternisé), ci-après appelé L-Ser-4-APA, dont la formule est la suivante :



### 7.2 : Synthèse de L-Ser-4-APA :

A l'instar de ce qui a été exposé pour la L-Pro-4-APA (paragraphe 6.2 ci-dessus), cette synthèse a déjà été réalisée au paragraphe 1.2 ci-dessus, selon deux méthodes A et B, dans lesquelles l'acide aminé Alanine a été remplacé par l'acide aminé Sérine. Il convient de s'y reporter pour connaître la synthèse de la L-Ser-4-APA.

### 7.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant du L-Séryl-9(4-aminophenyl)acridine (ci-après référencé L-Ser-4-APA) est préparé comme suit : 30 milligrammes de L-Ser-4-APA sont ajoutés à 4 grammes d'agar Columbia, additionnés à 0,1 litre d'eau distillée puis autoclavés. Ce milieu réactionnel est mis à l'autoclave à 116°C pendant 20 minutes. La majeure partie du substrat se retrouve en solution, sans coloration résiduelle.

Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont été ensemencés sur ce milieu à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Des échantillons de 10 µl de chaque suspension

sont ensuite cultivés pour produire des colonies. Les colonies formées ont été examinées visuellement après 18 à 24 heures d'incubation.

La coloration de ces colonies a été notée avant et après ajout d'une goutte d'acide acétique, ci-après GAA (glacial acetic acid).

5

#### 7.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 7 ci-dessous :

SOUCHES	GAA	0,3 g/l de L-Ser-4-APA	
		Couleur	Intensité
<i>Escherichia coli</i> (009)	avant GAA	crème	-
	après GAA	orange pâle	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (012)	avant GAA	crème	-
	après GAA	orange pâle	2
<i>Yersinia enterocolitica</i> (061)	avant GAA	crème	-
	après GAA	orange pâle	2
<i>Candida albicans</i> (138)	avant GAA	crème	-
	après GAA	crème	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (008)	avant GAA	crème	-
	après GAA	crème	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (117)	avant GAA	crème	-
	après GAA	crème	-

10 Tableau 7 : Révélation de l'activité L-Sérine-aminopeptidase de micro-organismes par  
de la L-Ser-4-APA dont la concentration en substrat est optimisée

Encore une fois, certaines souches ont une inhibition partielle avec le substrat à base d'acridine. Les trois souches à Gram négatif testées produisent une coloration  
15 réactionnelle particulière après l'addition d'acide acétique.

### Autres expériences réalisées :

D'autres substrats ont été testés qui permettent de valider les résultats présentés ici, on peut par exemple citer :

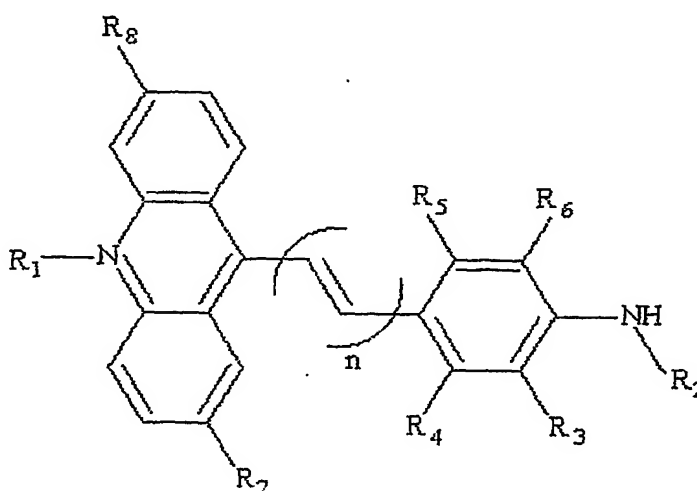
- L-Alanyl 9-(4-amino-3-methoxyphenyl)-10-methylacridinium chloride,
- L-Alanyl 9-(4-aminophenyl)-10-methylacridinium chloride hydrochloride,
- L-Alanyl 9-(4-amino-2,5-dimethoxyphenyl)-10-methylacridinium chloride hydrochloride,
- $\beta$ -Alanyl 9-(4-aminophenyl)-10-methylacridinium chloride hydrochloride,
- $\beta$ -Alanyl-9-(4-amino-2-methoxy-aminophenyl) acridine,
- $\beta$ -Alanyl-9-(4-amino-2,5-dimethoxy-aminophenyl) acridine,
- $\beta$ -Alanyl 9-(4-amino-3-methoxyphenyl)-10-methylacridinium chloride hydrochloride,
- $\beta$ -Alanyl 9-(4-amino-2,5-dimethoxyphenyl)-10-methylacridinium chloride hydrochloride.

De même d'autres espèces de micro-organismes, généralement des bactéries, ont également été testés, telles que :

- *Salmonella typhimurium*,
- *Staphylococcus epidermidis*,
- *Serratia marcescens*.

## REVENDICATIONS

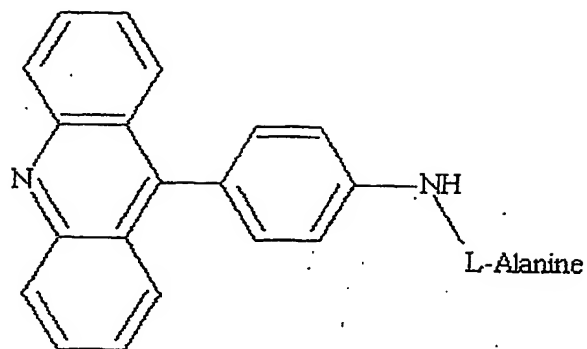
1. Substrats chromogéniques enzymatiques pour la détection chez des micro-organismes d'une activité aminopeptidase ou pour définir l'appartenance d'au moins une bactérie au groupe des Gram positifs ou des Gram négatifs selon sa coloration, caractérisés par le fait qu'ils ont la formule suivante :



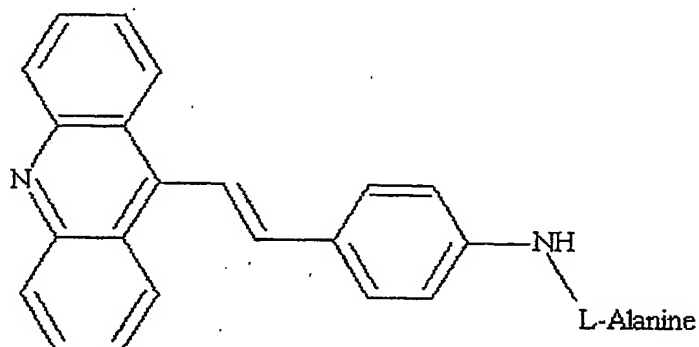
dans laquelle :

- 10    • R<sub>1</sub> est rien ou un groupement alkyle, allyle, aryle,
- R<sub>2</sub> est constitué par au moins un acide aminé, préférentiellement alanine,
- R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> sont constitués indépendamment l'un de l'autre par H- ou -O-alkyle, préférentiellement -O-CH<sub>3</sub>,
- R<sub>7</sub> est constitué par H, O-CH<sub>3</sub>, alkyle ou halogène,
- 15    • R<sub>8</sub> est constitué par H ou Cl, et
- n est un chiffre entier correspondant à 0 ou 1 ou 2.

2. Substrat, selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il a la formule suivante :



ou qu'il a la formule suivante :

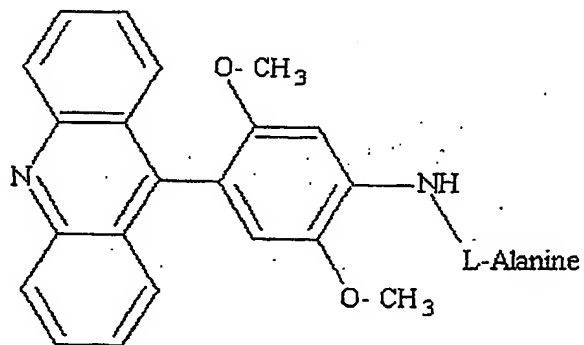


5

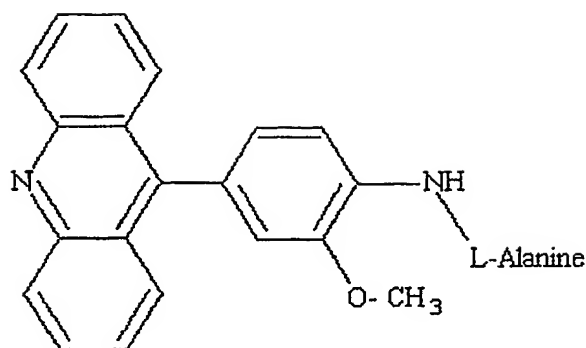
3. Substrats, selon la revendication 1, caractérisés par le fait que  $R_1$  est un groupement méthyle ou allyle.

4. Substrats, selon la revendication 1, caractérisés par le fait qu'il a la formule suivante :

10



ou qu'il a la formule suivante :



5. Milieu de culture utilisant au moins un substrat chromogénique enzymatique, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, seul ou en combinaison avec au moins un autre substrat enzymatique spécifique d'une activité enzymatique différente de celle détectée par le substrat selon l'invention.

6. Milieu, selon la revendication 5, caractérisé par le fait qu'il est constitué par un milieu gélifié.

7. Utilisation des substrats chromogéniques enzymatiques, tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 4, ou d'un milieu de culture, selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, pour la détection chez des micro-organismes d'au moins une activité aminopeptidase.

8. Utilisation des substrats chromogéniques enzymatiques, tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 4, ou d'un milieu de culture, selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, pour séparer les bactéries à coloration à Gram positif des bactéries à coloration à Gram négatif.

9. Procédé pour la détection chez des micro-organismes d'au moins une activité aminopeptidase, caractérisé en ce qu'il consiste à :

- disposer d'un milieu de culture, selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6,
- ensemercer le milieu avec un échantillon biologique à tester,
- laisser incubé, et

- révéler la présence d'au moins une activité aminopeptidase seule ou en combinaison avec au moins une autre activité enzymatique différente d'une activité aminopeptidase.

5            10. Procédé pour la différenciation chez des bactéries de leur appartenance aux germes du type Gram positif ou aux germes du type Gram négatif, caractérisé en ce qu'il consiste à :

- disposer d'un milieu de culture, selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6,
- ensemercer le milieu avec un échantillon biologique à tester,
- 10    • laisser incuber, et
- révéler la présence d'au moins une coloration synonyme de la présence de germe(s) du type Gram négatif.

15           11. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce que, lorsque l'azote en position 10 du groupement acridine n'est pas quaternisé, la révélation de la présence d'au moins une activité aminopeptidase est réalisée par l'ajout d'acide, préférentiellement d'acide chlorhydrique, d'acide acétique ou d'acide citrique, sur la culture.

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 © W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		ACRIDINE
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		FR03/00953
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
Substrats enzymatiques, milieux de culture les contenant, utilisation pour détecter une activité aminopeptidase et/ou différencier des bactéries à Gram + par rapport à des bactéries à Gram -		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
bioMérieux		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Nom	RIGBY
	Prénoms	Annette
Adresse	Rue	Prospect House - Comb Hill Haltwhistle
	Code postal et ville	NE49 9NS - NORTHUMBERLAND - GRANDE-BRETAGNE
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Nom	JAMES
	Prénoms	Arthur
Adresse	Rue	The Timbers - Hillside Road East Rothbury
	Code postal et ville	NE65 7PT - NORTHUMBERLAND - GRANDE-BRETAGNE
Société d'appartenance (facultatif)		
<input type="checkbox"/> 3	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
14 février 2003  Laurent CAUCAL PG 7409		

PCT/FR2004/050031

